

L. Strauss^{1,2} · D. Volland² · A. Guerrero³ · T. Reichert²

¹Abteilung Onkologie, Universitätsspital Zürich

²Abteilung MKG-Chirurgie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

³Instituto de Ciencias Biomedicas (ICBM), Universidad de Chile, Santiago de Chile

Tumorangiogenese und Immunsuppression

Strategische Angriffspunkte für neue Therapieansätze beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (HNSCC)

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Tumorangiogenese und tumorassoziierte Immunsuppression sind Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Tumorevolution. Unsere bisherigen Analysen zeigen, dass Mundhöhlenkarzinomzellen über eine Produktion von TGF- β 1 („transforming growth factor-beta1“) und MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1“) die Makrophageninfiltration in den Tumor stimulieren. Die angelockten Makrophagen produzieren den angiogenetischen sowie immunsupprimierenden Wachstumsfaktor VEGF („vascular endothelial growth factor“) und induzieren zudem die Produktion dieses Faktors über Interleukin (IL)-1 α in den Tumorzellen. Neue In-vitro-Studien zeigen, dass Retinsäure (Vitamin A) die TGF- β 1- und MCP-1-Produktion der Tumorzellen hemmt. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss von Retinsäure auf die Makrophageninfiltration und VEGF-Produktion im Mausmodell analysiert.

Material und Methoden: Mäusen der AJ-Linie (10 Mäuse pro Gruppe) wurden Polyethylschwämme (5×2 mm³) mit humanen HNSCC-Zellen (450.000–150.000/10 μ l RPMI) subkutan eingepflanzt. Mäuse mit Tumoren von mindestens 0,7–1 cm³ Durchmesser wurden täglich mit Retinsäure (160 μ g/kg) i.p. behandelt. Nach 21 Tagen wurden die Schwämme entnommen und immunhistologisch nach VEGF-A, MCP-1, CD68 und CD31 untersucht. Die Bestimmung der Serumwerte von VEGF-A und MCP-1 erfolgte mit dem ELISA. Die Organe wurden entnommen und nach Makro- und Mikrometastasen untersucht.

Ergebnisse: Bei allen mit Retinsäure behandelten Tieren kam es zur vollständigen Tu-

morregression. Die Mäuse wiesen keinen Metastasenbefall auf ($p=0,00$) und die Makrophageninfiltration in den Tumor konnte blockiert werden ($p=0,007$). Alle behandelten Tiere regulierten die MCP-1- (0 pg/ml) und VEGF-A-Serumwerte (12 pg/ml) herunter ($p=0,001$).

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, dass die Blockierung der Makrophageninfiltration in den Tumor mit Vitamin A ein möglicher Therapieansatz ist, um die Induktion der zwei wichtigsten Überlebensstrategien des Tumors, Immunsuppression und Angiogenese, zu hemmen.

Schlüsselwörter

Makrophageninfiltration · „Vascular endothelial growth factor“ · Angiogenese · Immunsuppression · Retinsäure

Die primären Tumorzellen bilden avaskuläre Nester, die sich zunächst über einfache Diffusion ernähren [10]. Diese ersten Tumorzellen müssen den Angriff des Immunsystems des Wirtes überleben und ein Netz von Neokapillaren sowie Lymphgefäßen bilden, um ein effektives Tumorstadium zu entwickeln zu können. Folkmann et al. berichteten, dass ein Tumor ohne eigenes Kapillarnetz nur eine Tumormasse von 1–3 mm³ erreichen kann [8]. Studien der letzten zehn Jahre zeigen, dass bei Patienten mit soliden Tumoren sowie im Mausmodell

die Ausreifung der tumorinfiltrierenden sowie peripheren dendritischen Zellen (DC) zu reifen DC supprimiert wird und unreife DC wichtige Kostimulationsmoleküle sowie den Haupthistokompatibilitätskomplex MHC-II (HLA-DR) minderexpressieren [9]. DC sind verantwortlich für die Präsentation der Tumorantigene und somit für die Induktion von tumorspezifischen T-Effektorzellen [3].

Bisher konnten die Ursachen und Mechanismen, die der Suppression der Immunzellen bei Tumorpatienten zugrunde liegen, nicht eindeutig geklärt werden [5]. Neuere Publikationen zeigen, dass in malignen Tumoren, unter anderem im Mundhöhlenkarzinom, autokrine Regelkreise für angiogenetische sowie immunsupprimierende Wachstumsfaktoren und Zytokine existieren, die in direkter Interaktion mit dem Tumormilieu stehen [16]. Eine hohe Makrophagendichte im Tumorstroma korreliert in vielen malignen Tumoren mit einer erhöhten Gefäßdichte sowie einer schlechten Prognose [12]. Wir konnten in unseren bisherigen Studien zeigen, dass HNSCC-Zellen sowie tumorinfiltrierende Makrophagen den Wachstumsfaktor VEGF-A („vascular endothelial growth factor A“) überexpressieren und dass dieser direkt mit einer

Online publiziert: 11. August 2005
© Springer-Verlag 2005

Dr. L. Strauss

Abteilung Onkologie, Universitätsspital Zürich,
Rämistrasse 100, CH-80091 Zürich

E-Mail: strauss_ewers@hotmail.com

L. Strauss · D. Volland · A. Guerrero ·
T. Reichert

Antiangiogenic and anti-immunosuppressive therapeutic strategies in human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)

Abstract

Background: Angiogenesis and tumor-associated immunosuppression are two of the hallmarks of carcinogenesis. In previous studies we demonstrated in vitro that HNSCC tumor cells attract monocytes via monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and activate them via transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) to secrete interleukin (IL)-1 α , which in turn stimulates tumor cells to secrete increased levels of the angiogenic and immunosuppressive vascular endothelial growth factor (VEGF). These findings suggest that interaction between the immune system and VEGF-mediated angiogenesis is important for progression of HNSCC. Recent studies in vitro show that retinoic acid (RA) downregulates the release of MCP-1 and TGF- β 1 by tumor cells. Therefore, we investigated the ability of RA to modulate the ability of tumor cells to recruit and activate monocytes for participation in VEGF-mediated angiogenesis and immunosuppression in vivo.

Material and methods: Mice (ten/group) were injected daily with RA (160 μ g/kg) for 3 weeks. After that time mice were sacrificed, and paraffin sections of tumors were obtained and stained for VEGF-A, CD68, and PECAM (CD31) by immunohistochemistry. The lungs, liver, and myocardium were analyzed for macro- and micrometastases. The plasma protein levels of VEGF-A and MCP-1 were determined by ELISA.

Results: In RA-treated mice tumors regressed completely and RA prevented metastases ($p=0.00$) and macrophage infiltration ($p=0.007$). Treated mice downregulated VEGF-A (0 pg/ml) and MCP-1 (12 pg/ml) in peripheral blood ($p=0.001$).

Conclusion: Our findings suggest a new therapeutic possibility: the development of treatment protocols that can block each of the ways in which tumors induce new blood vessel growth and immunosuppression of the host.

Keywords

Macrophage infiltration · VEGF · Angiogenesis · Immunosuppression · Retinoic acid

Originalien

schlechten Krankheitsprognose, der Gefäßdichte, dem Lymphknotenstatus, der Makrophagendichte und einer erhöhten Anzahl unreifer DC korreliert [23, 26]. VEGF supprimiert in vitro die Ausreifung der DC-Prekursorzellen zu reifen DC sowie deren Fähigkeit, naive T-Zellen nach Antigenpräsentation zu stimulieren [4, 23, 26].

Der Wachstumsfaktor VEGF-A ist ein Glykoprotein, das mittlerweile als „Schlüsselwachstumsfaktor“ bei physiologischen und pathologischen angiogenetischen sowie immunsuppressiven Prozessen diskutiert wird [7]. Neuere Studien suggerieren, dass DC eine duale Funktion bei der Modulation der Immunantwort je nach Reifegrad, Herkunft, Zellmarkerexpression sowie Zytokinprofil des unmittelbaren Mikromilieus haben [13, 22]. Reife DC induzieren nach Antigenpräsentation in naiven T-Lymphozyten T-Effektorzellen. Unreife DC dagegen stimulieren nach Antigenpräsentation suboptimal die naiven T-Zellen und induzieren deren Ausdifferenzierung zu T-Regulationszellen (Tr-Zellen). Letztere induzieren Anergie in autoreaktiven T-Zellen und T-Effektorzellen über direkten Zell-Zell-Kontakt sowie TGF- β („transforming growth factor-beta“) und IL-10 (Interleukin 10) und verhindern somit eine exzessive Immunantwort [11,

15]. Eine ausgewogene Balance zwischen T-Effektorzellen und Tr-Zellen ist deshalb Grundvoraussetzung für den Erhalt der Immunhomöostase. Die Induktionsmechanismen von Tr-Zellen in vivo sowie ihre Partizipation bei Tumorpatienten wurden bisher kaum untersucht [18]. Wir konnten in Vorarbeiten zum ersten Mal eine Hochregulierung der Tr-Zellen in Blut, Lymphknoten sowie Tumorgewebe bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten nachweisen und zudem zeigen, dass die VEGF-A-Überexpression direkt mit der Tr-Zellen-Prävalenz und unreifen DC korreliert [23, 26].

Eine detaillierte Kenntnis der Induktion sowie der Regulationsmechanismen von VEGF im Tumor ist aufgrund seiner angiogenetischen und immunmodulierenden Eigenschaften notwendig, um Ansatzpunkte für neue immunstrategische Therapien bei Krebspatienten zu finden. Unsere bisherigen Studien sowie die Arbeiten von Liss et al. zeigen in vitro, dass HNSCC-Zellen MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1“) und TGF- β sezernieren, welche die Monozytenmigration in den Tumor stimulieren, die tumorinfiltrierenden Makrophagen zu einer IL-1 α -Produktion aktivieren und diese über IL-1 α in den Tumorzellen VEGF-

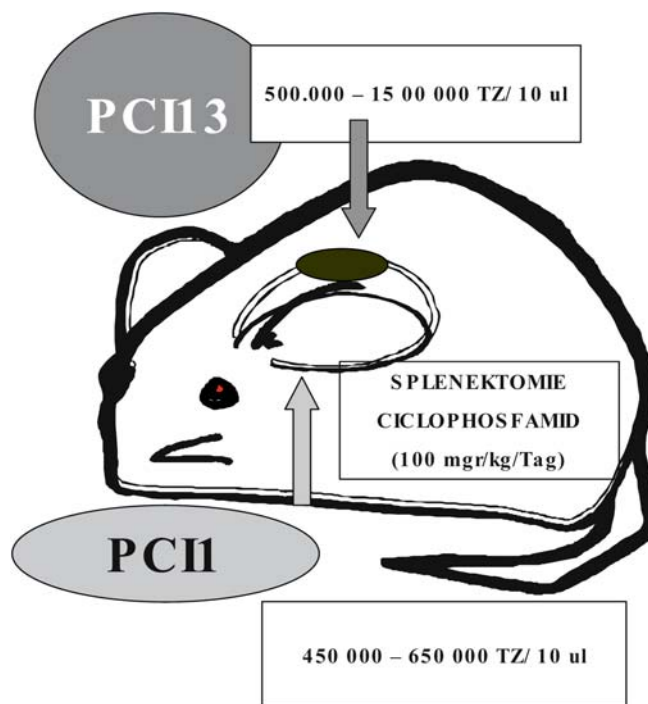


Abb. 1 ► HNSCC-Modell in der Maus nach Boyle u. Mangin [4]. Zur Methodik s. Tumormodell

Tabelle 1
Kontrollgruppen und behandelte Gruppen

Gruppe	Schwamm	Therapie (7 Tage post Übertragung der Schwämme)	Behandlungszeitraum
Kontrolle (PBS)	10 µl PBS		
Kontrolle (Tumor)	PCI-1 (450.000–650.000 Zellen/10 µl RPMI) PCI-13 (650.000–1.500.000 Zellen/10 µl RPMI)		
Vitamin A	PCI-1 (450.000–650.000 Zellen/10 µl RPMI) PCI-13 (650.000–1.500.000 Zellen/10 µl RPMI)	Vitamin A	Täglich/21 Tage
Betamethason	PCI-1 (450.000–650.000 Zellen/10 µl RPMI) PCI-13 (650.000–1.500.000 Zellen/10 µl RPMI)	Betamethason	Täglich/21 Tage
Vitamin A + Betamethason	PCI-1 (450.000–650.000 Zellen/10 µl RPMI) PCI-13 (650.000–1.500.000 Zellen/10 µl RPMI)	Vitamin A + Betamethason	Täglich/21 Tage

Für jeden Therapieansatz wurde eine Gruppe von 10 Mäusen gebildet. Je Therapieansatz wurde eine Kontrollgruppe von 5 Tieren mit in Tumorzelllösung und eine Gruppe von 5 Tieren mit in PBS getränkten Schwämmen ohne Behandlung als Negativkontrollen erstellt. Nach 7 Tagen Tumorevolution wurden die Tiere, die Tumorknoten von mindestens 0,7–1 cm³ gebildet hatten, behandelt.

Tabelle 2
Bei den Therapieansätzen verwendete Konzentrationen der pharmazeutischen Produkte

Medikament	Konzentration
Retinsäure (Vitamin A)	160 µg/kg/Tag
Betamethason	16.000 ng/kg/Tag
Vitamin A + Betamethason	160 µg Vitamin A + 16.000 ng Betamethason/kg/Tag

A induzieren. Zudem konnten wir in vivo zeigen, dass die Überexpression von TGF-β sowie IL-1α signifikant mit der VEGF-A-Expression bei HNSCC-Patienten korreliert [23, 25]. Daher vermuten wir, dass die Makrophageninfiltration ein wichtiger Kontrollpunkt bei der Regulation der Angiogenese, Immunsuppression sowie peripherer Immuntoleranz über VEGF-A bei Tumorpatienten ist. In der vorliegenden Studie wurde nach Therapieansätzen gesucht, welche die Makrophageninfiltration in den Tumor und deren Aktivierung hemmen. Da die Studien von Liss et al. in vitro zeigen, dass Retinsäure (Vitamin A) die TGF-β₁- und MCP-1-Produktion in Tumorzellen hemmt [17], haben wir im HNSCC-Mausmodell den Einfluss von Retinsäure auf die Makrophageninfiltration, VEGF-A-Produktion, Gefäßdichte sowie das Tumorwachstum analysiert. Zudem wurde die Effizienz von Vitamin A mit der von Betamethason, dass ebenfalls die Makrophageninfiltration hemmt, verglichen.

Methoden

Kulturmedien und Antikörper

Die in unserem Labor etablierten HNSCC-Linien PCI-1 und PCI-13 wurden in RPMI-1640-Medium mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin sowie 10% DMSO kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 4–5 Tage gewechselt.

Bei unseren immunhistologischen Untersuchungen verwendeten wir folgende Antikörper: PECAM (CD31; H-30, Santa Cruz), VEGF-A (C-1, Santa Cruz) und CD68 (T-16, Santa Cruz). Die Tiere wurden mit folgenden pharmazeutischen Produkten behandelt: Retinsäure (Vitamin A; Sigma), Betamethason (Laboratorio Chile S.A.), Cyclophosphamid (Endoxan; Laboratorio Chile S.A.), Diazepan (Laboratorio Chile S.A.), Atropin (Laboratorio Chile S.A.) und Ketamin (Laboratorio Chile S.A.).

Mäuse

Für die Tierexperimente wurden 25 g schwere und 2 Monate alte Mausweibchen (*Mus musculus*) der Mauslinie AJ verwendet. Sie wurden vom Institut für Immunologie und Pharmakologie der Medizinischen Fakultät der Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile gestellt. Die Tiere wurden bei 25°C Raumtemperatur in Gruppen von 10 Mäusen/Käfig gehalten. Sie erhielten Pellet und Leitungswasser ad libitum.

Die „principles of laboratory animal care“ (NIH publication No. 86–23, revised 1985) wurden eingehalten.

Tumormodell

Sterile Polyethylenschwämme (5×2 mm) wurden mit PBS oder HNSCC-Zelllösung (PCI-1 oder PCI-13) imprägniert. Anschließend wurden die Schwämme in immunsupprimierte Mäuse subkutan dorsal rechts nach Boyle u. Mangan [4] eingepflanzt (Abb. 1). Das Fassungsvermögen eines Schwammes beträgt 10 µl RPMI. Die kultivierten HNSCC-Zellen wurden in RPMI gewaschen, zentrifugiert, gezählt und in 2 ml RPMI aufgefangen. Die autoklavierten Schwämme wurden für 1 min in die Tumorzelllösung gelegt und anschließend in die Maus überführt. Wir haben je Schwamm 450.000–1.500.000 Tumorzellen pro 10 µl RPMI verwendet. Die Zellanzahl variierte mit der Wachstumsrate der HNSCC-Zelllinien. Das Gewicht der Mäuse und das Tumolvolumen wurden täglich bestimmt.

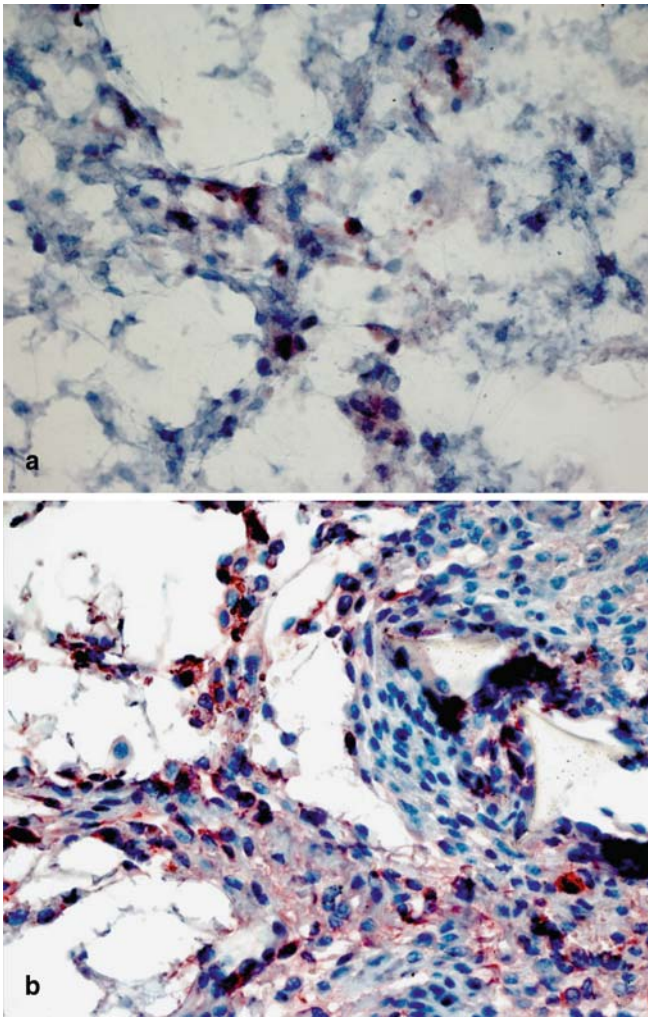


Abb. 2 ◀ **Makrophageninfiltration im Schwamm a bei mit Retinsäure (Vitamin A) behandelten Mäusen, b bei Kontrollmäusen. Die Schnitte wurden auf die Expression des Makrophagen-Zelloberflächenmarker CD68 immunhistologisch untersucht. Die immunhistologischen Untersuchungen der Schnittpräparate erfolgte mit der Avidin-Biotin-Methode unter Verwendung von alkalischer Phosphatase als Markerenzym und Fuchsin als Chromogen. Vergr. 400:1**

Nach 1 Woche Tumorevolution und Vorhandensein eines Tumorknotens von mindestens 0,7–1 cm³ wurden die Tiere mit Retinsäure (Vitamin A), Betamethason oder der Kombination Vitamin A/Betamethason für 21 Tage i.p. behandelt. Nach 21 Tagen wurden die Mäuse anästhesiert, und nach Entnahme von 1 ml Blut aus der Halsschlagader durch zervikale Dislokation getötet. Die Schwämme wurden in 10%igem Formalin für 24 h fixiert, in Paraffin eingebettet und immunhistologisch auf die Expression von CD68 (1:50), VEGF-A (1:100) und PECAM1 (CD31; 1:50) untersucht. Dann erfolgte die Entnahme der Organe, die häufig von Metastasen befallen werden (Lunge, Leber, Herz und Nieren) und deren Untersuchung nach Makrometastasen mit der Lupe. Anschließend wurden Hämatoxylin-Eosin-Schnitte für die Analyse von Mikrometastasen mithilfe der Lichtmikroskopie angefertigt.

Anästhesie der Mäuse

Die Anästhesie erfolgte mit Diazepam (10 mg/kg) i.p. Fünf Minuten nach der Induktion wurden die Mäuse mit Atropin (0,1 mg/kg) und Ketamin (100 mg/kg) i.p. anästhesiert. Die pharmazeutischen Produkte wurden mit 1-ml-Spritzen in 0,1 ml Endlösung (PBS) verabreicht.

Immunsuppression der Mäuse

Den anästhesierten Tieren wurde die Milz entnommen (Splenektomie). Am Tag nach der Splenektomie wurden die Mäuse für 5 Tage mit Cyclophosphamid (100 mg/kg) i.p. behandelt. Nach 5 Tagen Immunsuppression wurden die Schwämme eingepflanzt.

Experimentelle Gruppen und Therapieansätze

Für die Versuche wurden 60 Mausweibchen (*Mus musculus*) der Mauslinie AJ verwendet. Für jeden Therapieansatz wurde eine Gruppe von 10 Mäusen gebildet. Diese Gruppe bestand aus jeweils einer Kontrollgruppe von 5 Tieren mit in Tumorzelllösung getränkten Schwämmen und einer Gruppe von 5 Tieren (Negativkontrollen) mit in PBS getränkten Schwämmen ohne Behandlung.

Nach 7 Tagen Tumorevolution wurden die Tiere, die Tumorknoten von mindestens 0,7–1 cm³ gebildet hatten, mit Retinsäure (Vitamin A, 160 µg/kg/Tag), Betamethason (16.000 ng/kg/Tag) oder der Kombination Betamethason/Vitamin A i.p. für 21 Tage behandelt. Mäuse, die keine eindeutigen Tumorknoten von 0,7–1 cm³ gebildet hatten, wurden aus der Gruppe ausgeschlossen. Bei diesen Tieren wurde das Experiment zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt.

Die experimentellen Gruppen sowie die verwendeten Konzentrationen der pharmazeutischen Produkte sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst.

Bestimmung des Tumorwachstums und des Tumolvolumens (cm³)

Die Höhe und Breite des Tumors wurden 7 Tage nach der Übertragung täglich in Millimetern ausgemessen. Die Bestimmung des Tumolvolumens (cm³) erfolgte nach der Standardformel für solide Tumore von O'Reilly et al. [21]

$$\text{Volumen} = (\text{Breite})^2 \times (\text{Höhe})^2 \times 0,52$$

Auswertung der in Paraffin eingebetteten Schwämme

Die Auswertung der Expression von CD68, VEGF-A und PECAM1 in 60 Polyethylenschwämmen erfolgte semiquantitativ in der nachfolgend beschriebenen Weise. Von jedem Schwamm wurden 6 aufeinander folgende Paraffinschnitte (4–6 µm dick) angefertigt. Jeder Schwamm wurde zwecks Auswertung in 2 Zonen aufgeteilt: Der Schwamm (Zone 1) und das angrenzende Gewebe (Zone 2). Der Flächeninhalt der Zählfelder war abhängig von der verwendeten Objektivergrößerung.

In der Regel wurde bei einer 400fachen Vergrößerung im Mikroskop („high

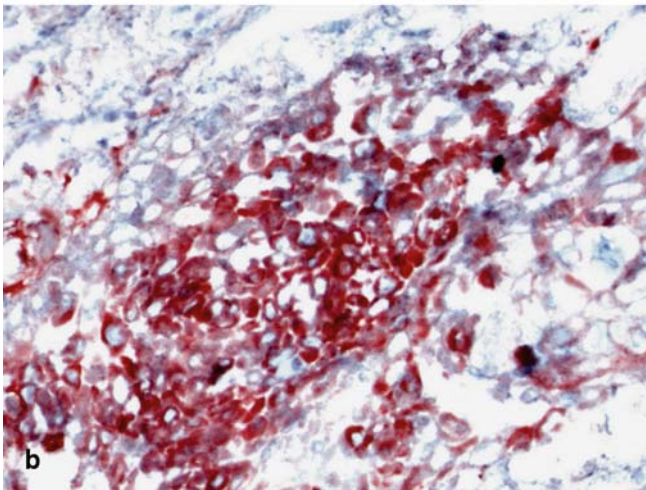
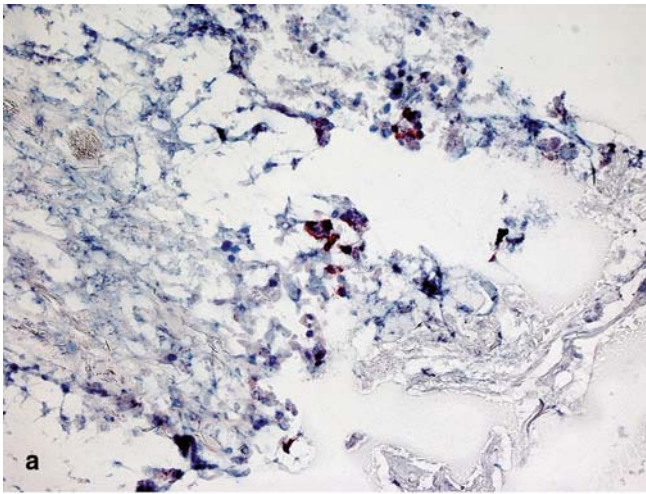


Abb. 3 ◀ **VEGF-A-Expression im Schwamm a bei mit Retinsäure (Vitamin A) behandelten Mäusen, b bei Kontrollmäusen. Die Schnitte wurden auf die Expression von VEGF-A immunhistologisch untersucht. Die immunhistologischen Untersuchungen der Schnittpräparate erfolgte mit der Avidin-Biotin-Methode unter Verwendung von alkalischer Phosphatase als Markerenzym und Fuchsin als Chromogen. Vergr. 400:1**

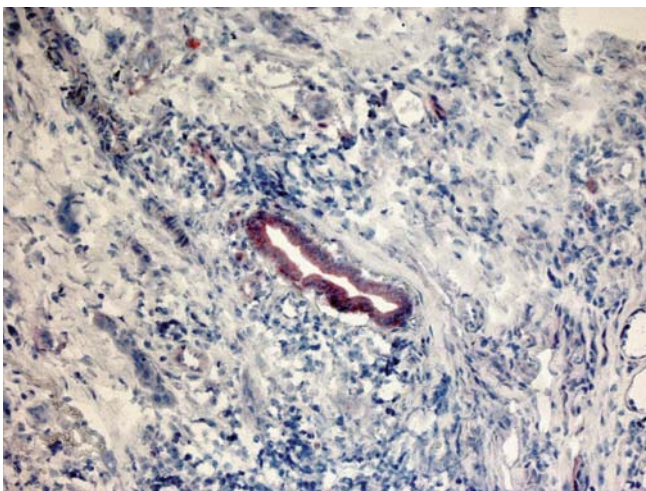


Abb. 4 ▲ **Positive Endothelzellen für CD31 (PECAM) im Schwamm bei mit Retinsäure (Vitamin A) behandelten Mäusen. Die Schnitte wurden auf die Expression des Endothelzellenmarkers CD31 (PECAM) immunhistologisch untersucht. Die immunhistologischen Untersuchungen der Schnittpräparate erfolgte mit der Avidin-Biotin-Methode unter Verwendung von alkalischer Phosphatase als Markerenzym und Fuchsin als Chromogen. Vergr. 400:1**

power field“, HPF) ausgezählt. Bei dieser Vergrößerung war die Identifizierung der zu zählenden Zellen optimal. Es wurden nur Zellen gewertet, die neben der immunhistologischen Anfärbung auch deutlich durch ihren Zellkern zu identifizieren waren. Bewertet wurden im Mittel 20 HPF pro Zone. In die Bewertung der Zellmarker- und VEGF-A-Expression ging sowohl der Anteil der immunhistologisch positiv markierten Zellen als auch die Intensität der Markierung ein. Die Farbintensität der Makrophagen, Endothelzellen sowie Tumorzellen wurde mit der Farbintensität der Zellen in den Schwämmen der Negativkontrollen verglichen und bewertet.

Die lichtmikroskopische Auswertung der immunhistologisch gefärbten Präparate erfolgte mit einem Lichtmikroskop der Firma Leica. Die fotografische Dokumentation wurde an einem DM/RBE-Mikroskop mit Wild-MPS-32/48-Fotoeinrichtung durchgeführt.

ELISA

Im Blut wurden VEGF-A und MCP-1 mit ELISA-Kit nach Angaben der Hersteller (R&D Systems und Pharmingen) bestimmt. Die Ergebnisse wurden in einem Microplate Reader bei 450 nm Wellenlänge und 540 nm Referenzlänge in 4 s gelesen (Modell 550, BioRad, München).

Immunhistologische Auswertung

Die Auswertung der CD68-, VEGF-A- und CD31-Expression in 60 Paraffinschnitten der Polyethylschwämme wurde semiquantitativ in der bereits beschriebenen Weise durchgeführt. Die Farbintensität der Makrophagen, Endothelzellen und Tumorzellen wurde mit der Farbintensität der Zellen in den mit PBS getränkten sowie in den mit HNSCC-Zellen getränkten, nichtbehandelten Schwämmen verglichen und bewertet.

Die lichtmikroskopische Auswertung der immunhistologisch gefärbten Präparaten erfolgte mit einem Lichtmikroskop der Firma Leica. Die fotografische Dokumentation wurde an einem DM/RBE-Mikroskop mit Wild-MPS-32/48- und Leica-IM50-Fotoeinrichtung durchgeführt.

Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programmpaket SPSS für Win-

Tabelle 3

Tumorevolution, Tumorprogression, Gefäßdichte, Makrophageninfiltration und Zytokinexpression bei Kontrollen und behandelten Tieren

	Tumorzvolumen [%]	Metastasen [%]	Tod [%]	VEGF-A	CD31	CD68	VEGF-A [pg/ml]	MCP-1 [pg/ml]
Kontrolle	100 (18,25×16,4 mm ³)	30	0	P: +++ S: +++++	P: ++ S: +++	P: ++ S: ++	20	24,4
Vitamin A	0	0	0	P: 0 S: 0	P: + S: +	P: 0 S: 0	0	0
Betamethason	30 (5,2×4,5 mm ³)	0	0	P: 0 S: 0	P: 0 S: 0	P: 0 S: 0	n.d.	n.d.
Betamethason + Vitamin A	35 (5,7×4,85 mm ³)	0	0	P: 0 S: 0	P: + S: +	P: 0 S: 0	n.d.	n.d.

P Peripherie, S Schwamm, n.d. not done.

Nach 7 Tagen Tumorevolution wurden Mäuse mit Tumorknoten von mindestens 0,7–1 cm³ mit Retinsäure (Vitamin A) (160 µg/kg/Tag), Betamethason (16.000 ng/kg/Tag) oder der Kombination Betamethason + Vitamin A i.p. für 21 Tage behandelt. Nach 21 Tagen wurde die VEGF-A- und MCP-1-Expression mit ELISA im Blut bestimmt und die entnommenen Schwämme immunhistologisch auf die Expression von CD68, CD31 und VEGF-A untersucht. Zudem wurden die Organe nach Makro- und Mikrometastasen untersucht.

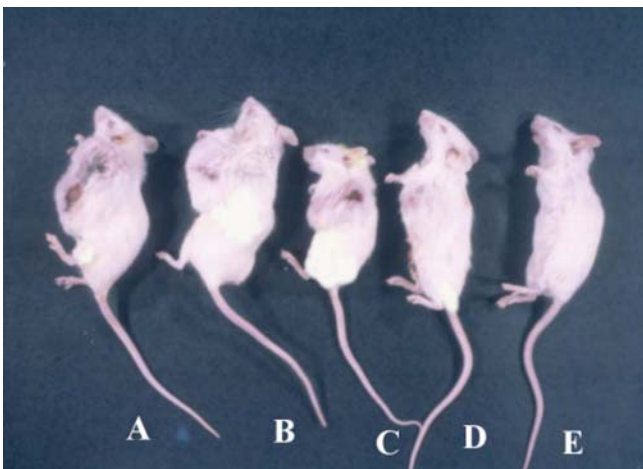


Abb. 5 ◀ **Tumorevolution der Kontrollen und behandelten Mäuse nach 21 Tagen Therapie.** A Kontrollmaus mit HNSCC (PCI-1) ohne Therapie, B Kontrollmaus mit HNSCC (PCI-13) ohne Therapie, C mit Betamethason behandelte Maus, D mit Betamethason + Vitamin A behandelte Maus, E mit Retinsäure (Vitamin A) behandelte Maus

dows, Version 7.0. Statistische Gruppenvergleiche wurden mit einem Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt [1]. Bei den Analysen, bei denen die Expression der Wachstumsfaktoren mit Merkmalen der Immun- und Stromazellen sowie dem Tumorprogress und Tumorzvolumen in Zusammenhang gebracht wurde, basierte die Angabe des *p*-Wertes auf dem Spearman-Test.

Ergebnisse

Blockierung der Makrophageninfiltration in den Tumor durch Retinsäure (Vitamin A) und Steroide (Betamethason)

Es wurden Therapieansätze untersucht, welche die Regelkreise für angiogeneti-

sche und immunsupprimierende Faktoren direkt im Tumor unterbrechen, ohne die Funktion und Regelkreise gesunder Zellen zu beeinflussen. Bei allen mit Retinsäure behandelten Tieren konnte die Makrophageninfiltration in den Tumor blockiert werden. Die Tumorschwämme waren negativ für den Makrophagenmarker CD68 sowie für VEGF-A und zeigten eine geringe Gefäßdichte (Abb. 2a, 3a und 4) im Gegensatz zu den Kontrollen, bei denen die Tumoren eine massive Makrophageninfiltration, hohe VEGF-A-Werte und eine hohe Gefäßdichte zeigten (*p*=0,007; Abb. 2b und 3b). Zudem kam es bei allen mit Retinsäure behandelten Tieren zur vollständigen Tumoregression (Abb. 5); die Mäuse wiesen keinen Metastasenbefall auf (*p*=0,00). Mäuse der Kontrollgruppe da-

gegen entwickelten Tumoren von 18×16 mm³ Durchmesser und zeigten Metastasenbefall in Leber, Herz und Lunge (Tabelle 3). Außerdem regulierten die mit Vitamin A behandelten Tiere die MCP-1- und VEGF-A-Serumwerte im Vergleich zu den Kontrollen signifikant herunter (*p*=0,001; Tabelle 3, Abb. 6a,b). Keines der behandelten Tiere verstarb vor Abschluss der Therapie.

Die Schwämme der mit Betamethason behandelten Tiere wurden nicht von Makrophagen infiltriert und waren frei von Gefäßen (Tabelle 3). Bei den mit Betamethason behandelten Tieren konnte das Tumorzvolumen in der ersten Behandlungswoche gehemmt werden (*p*=0,00). Eine komplette Regression des Tumors wurde aber mit Betamethason nicht erzielt (Abb. 5). Die Tumoren erreichten 30% des Volumens der Kontrollen. In der zweiten Behandlungswoche setzte der Tumor sein Wachstum wieder fort und erreichte das Tumorzvolumen der unbehandelten Kontrollen. Der Metastasenbefall der Organe war bei den mit Betamethason behandelten Mäusen niedriger als bei den Kontrollen (Tabelle 3). Durch die Behandlung mit einer Kombination aus Betamethason und Retinsäure konnte keine Potenzierung der Tumoregression und keine Suppression des Tumorprogresses induziert werden. Keines der mit Betamethason oder der Kombination Betamethason/Vitamin A behandelten Tiere verstarb vor Abschluss der Therapie.

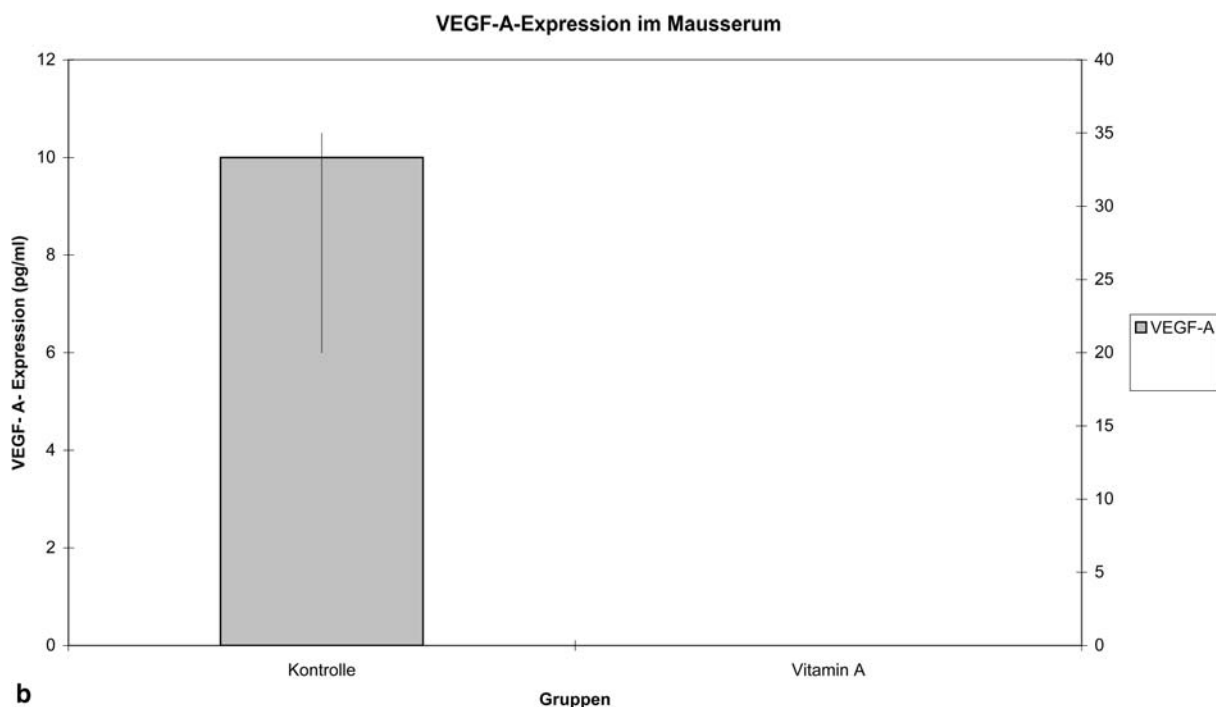
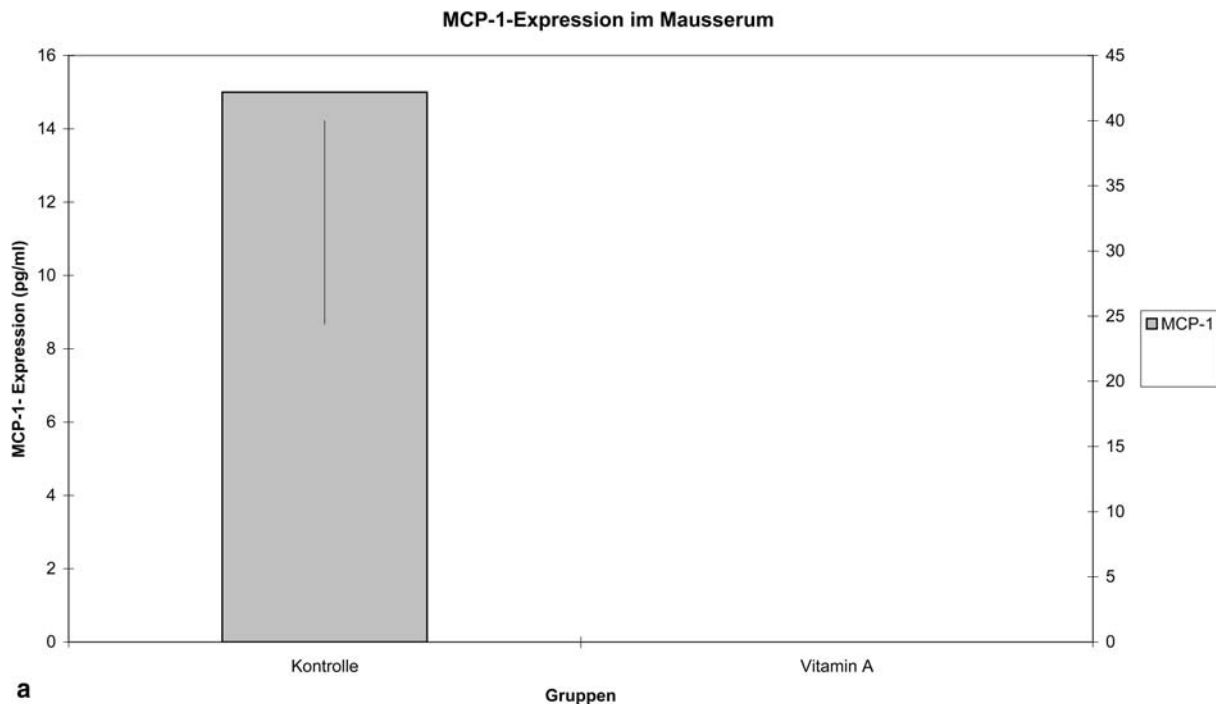


Abb. 6 ▲ Expression von MCP-1 (a) und VEGF-A (b) im Plasma bei Kontrollen und Mäusen nach Therapie mit Vitamin A. Nach 7 Tagen Tumorevolution wurden Mäuse mit Tumorknoten von mindestens 0,7–1 cm³ mit Retinsäure (Vitamin A, 160 µg/kg/Tag) behandelt. Nach 21 Tagen wurde die VEGF-A- und MCP-1-Expression im Blut mit dem ELISA bestimmt

Diskussion

Im Laufe eines Lebens bilden sich unzählige neoplastische Zellen, die aber bei Menschen mit immunologischem Gleichgewicht vom Immunsystem weit-

gehend erkannt und vernichtet werden [9]. Bei 95% der gesunden Erwachsenen ist eine lebenslange, asymptomatische Infektion mit dem Epstein-Barr- (EBV) oder humanen Papillomavirus (HPV) nachzuweisen [29]. Bei 60% der HN-

SCC-Patienten treten HPV16- oder HPV18-Infektionen auf [29]. Obwohl bei HPV-Infektionen die Onkoproteine E6 und E7, welche die Zellproliferation und maligne Zelltransformation regulieren, schon früh nach der Antigeninvasion

von den Zellen exprimiert werden, entwickeln Menschen mit intaktem Immunsystem keine Tumoren. Da die meisten malignen Tumoren sowie chronische Virusinfekte bei Patienten mit schwerer Immunsuppression diagnostiziert werden [9, 29] wird angenommen, dass es der Tumorzelle und dem Virus bei erkrankten Menschen gelingt, die Immunhomöostase des Wirtes über noch unbekannte Mechanismen zu unterbrechen. Dies ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Tumorentstehung. Wir konnten in bisherigen Studien zeigen, dass in HNSCC autokrine Regelkreise für den angiogenetischen sowie immunsupprimierenden Wachstumsfaktor VEGF-A existieren, der signifikant mit der Gefäßdichte, dem Lymphknotenstatus, der Makrophagendichte sowie unreifen dendritischen Zellen korreliert [23, 26]. Darüber hinaus ist es uns gelungen, zum ersten Mal bei HNSCC-Patienten T-Regulationszellen nachweisen und in vitro zu zeigen, dass mit VEGF-A behandelte unreife DC in T-Lymphozyten eine Toleranz gegenüber T-Zellen induzieren [23, 25, 26]. Demnach könnte die Blockade von VEGF aufgrund seiner immunmodulierenden und angiogenetischen Eigenschaften ein geeigneter Therapieansatz sein, um die zwei wichtigsten Überlebensstrategien des Tumors, die Angiogenese und Immunmodulation des Wirtes, zu hemmen. In den meisten bisherigen Arbeiten, die neue Therapieansätze bei malignen Tumoren untersuchen, wird versucht, VEGF-A oder seine Rezeptoren in vitro sowie in vivo zu blockieren. Die bisher erzielten Ergebnisse der Anti-VEGF-Therapien sind jedoch gering [14]. Auch wir konnten in HNSCC-tragenden Mäusen mit monoklonalen Antikörpern gegen VEGF-A das Tumorstromawachstum und den Tumorstromaprogress reduzieren, aber nicht hemmen [23]. Seit fünf Jahren wird die Tumorstromangiogenese und das Tumorstromwachstum von menschlichen Tumorzellen mittels dem in Materialien und Methoden beschriebenen Schwammmodell in immunsupprimierten Mäusen erfolgreich eingesetzt [20]. Maligne humane Tumortransplantate werden von immunsupprimierten Mäusen angenommen, ohne wichtige Eigenschaften des Tumors wie die Histologie, Zytokin-Expression, Karyotyp und Sensibilität gegenüber Medikamenten zu verändern [2, 28]. Da das humane VEGF-

Protein in seiner Aminosäurefrequenz dem Maus-VEGF in mehr als 98% gleicht [6, 27], ist es möglich, den Einfluss von humanem VEGF, das von in die Maus transferierten Tumorzellen produziert wird, auf Endothelzellen und Immunzellen der Maus zu analysieren. Eine der Ursachen für die Misserfolge der VEGF-blockierenden Therapieansätze ist sicher, dass VEGF ein sehr komplexes Glykoprotein mit zahlreichen Isoformen, proteolytischen Unterformen und Rezeptoren ist [7], welches über unzählige Mechanismen in Tumorzellen und Stromazellen induziert wird [5, 17]. Zudem ist bisher wenig über die Aktionsmechanismen, Induktion und biologischen Eigenschaften der einzelnen VEGF-Isoformen sowie ihrer Rezeptoren bei der Angiogenese und Immunmodulation bekannt. Deshalb müssen neue Therapieansätze gefunden werden, die den Regelkreis für VEGF im Tumor direkt unterbrechen, um die Expression von allen existierenden VEGF-Isoformen gleichzeitig zu unterbinden.

Unsere bisherigen Studien sowie die Arbeiten von Liss et al. lassen vermuten, dass die Makrophageninfiltration nicht die erste defensive Barriere bei Tumorpatienten bildet, sondern den Tumor über die Induktion von VEGF im Stroma und den Tumorzellen aktiv unterstützt. Deshalb haben wir in der vorliegenden Studie versucht, die Makrophageninfiltration in den Tumor zu blockieren. In Vorarbeiten war es gelungen, sie im Mausmodell mit Betamethason zu reduzieren [24]. Die immunsupprimierenden Nebeneffekte der Steroide ermöglichten allerdings keine erfolgreiche Langzeittherapie. Deshalb wurden humane HNSCC-tragende Mäuse mit Retinsäure (Vitamin A) behandelt. Bei all diesen Tieren kam es zur vollständigen Tumorstromregression und keiner Metastasierung. Die Makrophageninfiltration sowie die lokale und periphere VEGF-A- und MCP-1-Expression waren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant reduziert.

Schlussfolgerung

Diese Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese, dass die VEGF-Produktion über Interaktionen Tumorzelle-Makrophag in Tumorpatienten autokrin reguliert wird. Demnach ist die Makrophageninfiltration ein „Schlüsselfaktor“ für die Regulation der über VEGF-A induzierten Angio-

genese, Immunsuppression sowie peripheren Immuntoleranz bei HNSCC-Patienten. Auch dass die meisten Antigene in Abwesenheit von entzündlichen Prozessen und somit Makrophageninfiltration und VEGF-Produktion dem Wirt inoffensiv bleiben, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die von aktivierten Makrophagen induzierten Wachstumsfaktoren und Zytokine eine wichtige Rolle bei der Immunsuppression des Immunsystems sowie der Induktion peripherer Immuntoleranz spielen [19]. Demnach sind Therapieansätze, welche die Migration der Makrophagen in den Tumor hemmen, die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Tumorstromtherapie.

Literatur

- Altman DG (1991) Practical statistics for medical research. Chapman & Hall, London
- Asano M, Toda M, Sakaguchi S (1996) Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T-cell subpopulation. *J Exp Med* 184: 387
- Bancherau J, Steinmann RM (1998) DC and the control of immunity. *Nature* 392: 245–252
- Boyle EA, Mangan FR (1982) The effect of a novel, non-steroidal anti-inflammatory compound, nabumeton (BRL 14777), on cellular infiltration into 24-hour polyvinyl sponge implants in the rat, compared with some steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharm Pharmacol* 34: 570–575
- Broder S, Waldmann TA (1978) The suppressor-cell network in cancer (first of two parts). *N Engl J Med* 299: 1281–1284
- Chilov D, Kuk E, Taira S et al (1997) Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem* 272: 25176–25183
- Danekamp J (1990) Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer. *Cancer Metast Rev* 3: 267
- Folkman J, Weisz PB, Joullie MM, Li WW, Erwing WR (1998) Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. *Science* 243: 1490–1493
- Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR et al (1997) Production of vascular endothelial growth factor by human tumours inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2: 1096–1103
- Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J (1974) Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 52: 413–427
- Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Erik AH (2000) Induction of interleukin-10 producing, non proliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192: 1213

12. Joseph IB, Isaacs JT (1998) Macrophage role in the anti-prostate cancer response to one class of antiangiogenic agents. *J Nat Cancer Inst* 90: 1648–1853
13. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD (2000) Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 164: 1269–1276
14. Kranz A, Matfeld T, Waltenverger J (1999) Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer Pred Oncol* 84: 293–298
15. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG (2002) The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129: 263–276
16. Liss C, Fekete MJ, Hasina R, Lam CD, Lingen MW (2001) Paracrine angiogenic loop between head-and-neck-squamous-cell carcinomas and macrophages. *Int J Cancer* 93: 781–785
17. Liss C, Fekete MJ, Hosina R, Lingen MW (2002) Retinoic acid modulates the ability of macrophages to participate in the induction of the angiogenic phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*: 100: 283–289
18. Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G et al (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169: 2756–2761
19. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V (2000) Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of Ikappa-B-alpha ubiquitination. *Science* 289: 1560–1563
20. Nör JE, Peters MC, Christensen JB et al (2001) Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest* 81: 453–463
21. O'Reilly MS, Holmgren L, Shung Y et al (1994) Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 59: 471–482
22. Roncarolo MG, Levings MK, Travesari C (2001) Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* 193: F5–F9
23. Strauss L (2004) Regulation und Bedeutung der Makrophageninfiltration und des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in der Angiogenese, Immunsuppression sowie Induktion peripherer Immuntoleranz bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (HNSCC). *Promotionsschrift (Dr. rer. physiol.)*, Medizinischer Fachbereich der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
24. Strauss L, Fuenzalida M, Illanes J, Diaz E, Dabancan A, Lemus D, Guerrero A (2002) Effect of sulfated beta-cyclodextrin, a water soluble cycloamylose, on the promotion and/or inhibition of angiogenesis. *Pathol Oncol Res* 8: 47–53
25. Strauss L, Volland D, Kunkel M, Reichert T (2004) Immunsuppression: strategische Angriffspunkte für neue Therapieansätze beim oralen Plattenepithelkarzinom (ONSCC). 55. Jahrestagung der AGKi, 22.–24. Mai 2004, Bad Homburg
26. Strauss L, Volland D, Kunkel M, Reichert TE (2005) Dendritic cell maturation and VEGF-A as a control point for the maintenance of immune homeostasis. *Pathol Oncol Res* (in press)
27. Townson S, Lagercrantz J, Grimmond S, Silins G, Nordenskjöld M, Weber G, Hayward N (1996) Characterization of the murine VEGF-related factor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 922–928
28. Vandekerckhove BA, Namikawa R, Bacchetta R, Roncarolo MG (1992) Human hematopoietic cells and thymic epithelial cells induce tolerance via different mechanisms in the SCID-mouse thymus. *J Exp Med* 175: 1033–1043
29. Warrino DE, Olson WC, Knapp WT et al. (2004) Disease-stage variance in functional CD4⁺ T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus 16 E7 epitopes. *Clin Cancer Res* 10: 3301–3308